

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-185996

⑬ Int. Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)8月1日

C 07 K 3/00
A 61 K 39/29
C 07 K 13/00

8318-4H

7252-4C

8318-4H※審査請求 未請求 発明の数 17 (全20頁)

⑮ 発明の名称 B型肝炎e抗原の製造法およびその材料

⑯ 特 願 昭62-322654

⑰ 出 願 昭62(1987)12月19日

優先権主張 ⑱ 1986年12月19日 ⑲ 米国(US) ⑳ 944,645

㉑ 発 明 者 フィリップ・アール・アメリカ合衆国イリノイ 60085、ウオケガン、ジレット
アンデルセン ト・アベニュー 235番

㉒ 発 明 者 ラリー・テイ・ミム アメリカ合衆国イリノイ 60046、レイク・ビラ、ショー
ス ショーニ・トレイル 8番

㉓ 発 明 者 イサ・ケイ・マツシア アメリカ合衆国イリノイ 60087、ウオケガン、アーサ
ウオー ー・ドライブ 1923番

㉔ 出 願 人 アボット・ラボラトリー アメリカ合衆国イリノイ 60064、アボット・パーク(番
ーズ 地の表示なし)

㉕ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

B型肝炎e抗原の製造法およびその材料

2. 特許請求の範囲

(1) カオトロープで変性させすみやかに非変性バッファー中に希釈したときに、HBcAg免疫反応性は実質的になくなっているがHBsAg免疫反応性は保持している、HBcAg免疫反応性およびHBsAg免疫反応性を有するポリペプチドをコードする核酸配列からなるポリヌクレオチド。

(2) HBcAgをコードする配列の3'末端から120ヌクレオチドが欠けた核酸配列からなるものである特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(3) 第8図に示すヌクレオチド配列を有するものである特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(4) 該ポリペプチドが大腸菌発現産物である、特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチドのポリペプチド発現産物。

(5) 第5図に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドをBglⅡで消化した産物である特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(6) 第5図に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドをHaeⅢ、RsaⅠおよびHindⅢで消化した産物である特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(7) 特許請求の範囲第(1)項、第(2)項、第(3)項、第(5)項または第(6)項記載のポリヌクレオチドのポリペプチド発現産物。

(8) (a) 特許請求の範囲第(1)項のポリヌクレオチドを発現してHBcAgおよびHBsAg免疫反応性を有するポリペプチドを得、

(b) 前記ポリペプチドをカオトロープ剤中で変性させ、ついで

(c) 前記変性された蛋白質を非変性剤中にすばやく希釈すること

を特徴とする、HBsAg免疫反応性は有しているがHBcAg免疫反応性に欠けたポリペプチドの製造方法。

(9) 特許請求の範囲第(8)項記載の方法で得られたポリペプチド。

(10) (a) 特許請求の範囲第(3)項記載のポリヌクレオチドを発現してHBcAgおよびHBsAg免疫反応性を有するポリペプチドを得、

(b) 前記ポリペプチドをカオトロブ剤中で変性させ、ついで

(c) 前記変性された蛋白質を非変性剤中にすばやく希釈すること
を特徴とする、HBsAg免疫反応性は有しているがHBcAg免疫反応性に欠けたポリペプチドの製造方法。

(11) 特許請求の範囲第(10)項記載の方法で得られたポリペプチド。

(12) カオトロブ剤が塩酸グアナジンである特許請求の範囲第(8)項または第(10)項記載の方法。

(13) 非変性剤がヒト血漿である特許請求の範囲第(8)項または第(10)項記載の方法。

(14) 特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチドからなる、生物学的に機能のあるDNA嵌生物形質転換ベクター。

(15) 抗HBsでコーティングされた固体支持体を、試料および、特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドからなる中和剤と接触させ、ついでリポーターグループの結合した抗HBsに前記固体支持体を接触させ、固体支持体上に存在するリポーターグループを検出することを特徴とする、試料中のHBsAgに対する抗体の検出方法。

(16) 特許請求の範囲第(9)項のポリペプチドでコーティングされた固体支持体に試料をさらし、ついでリポーターグループの結合した特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドに前記固体支持体を接触させ、固体支持体上に存在するリポーターグループを検出することを特徴とする、試料中のHBsAgに対する抗体の検出方法。

(17) 特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドでコーティングされた固体支持体を、試料および、リポーターグループの結合した抗HBsと接触させ、固体支持体上に存在するリポーター

Agに対するモノクローナル抗体を産生する増地中のハイブリドーマを単離し、増地から該モノクローナル抗体を精製単離することと特徴とする、特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドに対するモノクローナルの製造方法。

(22) 特許請求の範囲第(21)項記載の方法により製造されたモノクローナル抗体。

(23) 薬学的に許容しうる希釈剤、アジュバントもしくは担体および特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドからなるワクチン。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、一般に、組換えDNA法によるB型肝炎ウイルス抗原(以下、HBsAgという)製造のための方法および材料に関する。とりわけ、本発明は、HBsAg活性を有するポリペプチドをコードするDNAに由来するHBsAg、および組換えHBsAgの変性および希釈による適当なエピトープの精製および派生(derivation)に関する。

〔従来技術〕

(20) 特許請求の範囲第(19)項記載の方法により製造されたポリクローナル抗体。

(21) 特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドの有効量で動物を免疫させ、該動物からの抗体産生細胞をミエロマ細胞と融合させ、HB

B型肝炎ウイルス(以下、HBVという)は、以前は「血清肝炎」として知られ、今はB型肝炎として知られている病気を引き起こす。世界中でHBVのキャリアーは2億人に達すると推定されている。該ウイルスの感染は、急性および/または慢性的の肝臓病の主要な原因である。HBVウイルスのキャリアーは、肝萎縮硬変および肝臓癌の高い危険性がある。

HBVは、ヒト血清中ではデイン粒子として同定されている。デイン粒子は、直径が42nmであり、脂質、DNA、および少なくとも4種のタンパク質、すなわち、B型肝炎表面抗原(以下、HBsAgという)、B型肝炎コア抗原(以下、HBcAgという)、HBcAgおよびDNAポリメラーゼを含んでいる。

HBcAgはデイン粒子のコアの一部であり、主要な構成ポリペプチドであって、HBVに感染したヒトの血清中では上述の形態、または免疫グロブリンG(以下、IgGという)と結合して存在する[イマイら(Imai et al)、J. Immunol.,

患者の血清である。HBcAgを血清から精製することは困難である。その理由は、HBcAgは非常に低い濃度(<1ng/ml)で存在し、しかもそれ自身同士またはIgGもしくは血清アルブミンと凝集し、そのため、分子量および電荷に関して分子的に不均質になるからである[ヤマデら(Yanade et al)、J. Gen. Virol., 55巻、75~86(1981)]。

血清HBcAgの精製には一般にアフィニティークラムが用いられ、その場合、抗HBcをリガンドとして用い、その上にHBcAgを含有する血清を循環させる。ついでHBcAgを、高い塩または低いpHのような厳しい条件を用いて溶出させる。溶出されたHBcAgをゲル濾過に付す[イマイら、J. Immunol., 128巻、69~72(1982)]。

HBcAgはまた、タンパク分解酵素、還元剤、音波処理、カオトロブ剤(chaotropic agents)での処理、またはCaCl₂中での勾配遠心を用いてHBcAgをHBsAgに変換することによって得る

128巻、69~72(1982)]。ヒト血清中にHBcAgが存在することは、高い感染性に関連しており、肝臓病の経過を予測する上で予後上価値を有する[マッケイら(MacKay et al)、J. Med. Virol., 8巻、237~243(1983)]。

HBcAgおよびHBsAgの両方ともデイン粒子のコアに結合しており[タカハシら(Takahashi et al)、J. Immunol., 22巻、275~279(1979)]、HBVゲノムの一つの領域にコードされている[ルーシンクラ(Roosinck et al)、Mol. Cell. Biol., 6巻、1393~1400(1986)]。したがって、予後指示薬としてのHBcAgの有用性にもかかわらず、イムノアッセイでの試薬として直接使用するためまたはそのようなイムノアッセイに使用するためのポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の産生を高めるために必要な、HBsAg活性およびHBcAg活性を有しないHBcAg調製物を製造することは困難である。

HBcAgの主要な採取源は、HBVに感染したこともできる[オーリイら(Ohori et al)、Intervirology, 13巻、74~82(1980)]。変換のためのHBcAgの採取源は、HBVに感染した患者の死後の肝臓である。肝臓由来のHBcAgからHBsAgを得るには、肝臓組織を抽出し、CsCl勾配上にベレット化して純粋なHBcAg調製物を得るようにしなければならない。ついでHBcAg調製物を、SDSおよびβ-メルカプトエタノールで処理してHBcAgが得られる[フェルンスら(Ferns et al)、J. Gen. Virol., 65巻、899~908(1984)]。しかしながら、感染された血清や組織を用いることは、それらに由来する抗原性調製物中に感染性の物質が保持されている危険性をはらんでいる。さらに、上記調製物では、HBcAgや他のHBV抗原でHBcAg調製物が汚染されることを完全に防ぐことはできない。

HBcAgを得る他の方法は、組換えHBcAgをタンパク分解酵素で消化する方法である(ヨーロッパ特許出願第75395号; およびマッケイら、

上述)。しかしながら、この方法で得られた HBeAg は HBcAg により相当汚染されており、低収率でしか回収することができない。

組換えプラスミドベクターを用いて哺乳類細胞中の HBV ゲノムのコア領域を発現させると HBeAg を分泌させることができる [ルーシングら、上述; ブルスら (Bruss et al)、B 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する 1986 年学会における論文のアブストラクト (Abstracts of Papers Presented at the 1986 Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses)、8 月 28 日～8 月 31 日、1986、於ニューヨーク、コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー、アブストラクト No. 14 (1984); オウら (Ou et al)、B 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する 1988 年学会における論文のアブストラクト、8 月 28 日～8 月 31 日、1986、於ニューヨーク、コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー、アブストラクト No. 15 (1982)]。

とができ [ブドコウスカ (Budkowska et al)、J. Immunol. Methods, 51 巻、341～346 (1982)]、また他の組換え発現産物をすばやく希釈して精製、変性したのち適当に還元させることもできる [(ブライアー (Prior et al)、PCT 公報 No. WO 85/05637)、組換え HBeAg (rDNA HBeAg) を変性および精製したのち HBcAg 活性をなくし HBeAg 活性のみを選択的に保持させるための方法が望まれている。

[発明の構成および効果]

本発明のポリヌクレオチドは、本質的に、HBcAg 免疫反応性および HBeAg 免疫反応性を有するポリペプチドをコードする核酸からなっており、このものは、カオトロプ (chaotrope) で変性させすみやかに非変性バッファー中に希釈したときに、HBcAg 免疫反応性は実質的になくなっているが HBeAg 免疫反応性は保持している。本発明の好ましいポリヌクレオチドは、第 8 図に示すポリヌクレオチドである。上記ポリヌクレオ

しかしながら、この方法によっても、HBcAg による汚染をなくすことはできない。

純粋な HBeAg を得る一つの方法は、HBeAg でない部分をコードする領域を取り除き (マッケイら、上述)、天然に存在する HBcAg をコードする配列のみを残すようにした [タカハシら、J. Immunol., 130 巻、2903～2907 (1983)] 組換え HBcAg コード配列の直接の遺伝子産物として HBeAg を表現することであると思われる。HBeAg コード領域の大腸菌遺伝子産物を産生することができるが [マ (Ma et al)、B 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する 1986 年学会における論文のアブストラクト、8 月 28 日～8 月 31 日、1986、於ニューヨーク、コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー、アブストラクト No. 25]、この種の方法で得られる産物は HBcAg 活性が残っており、有用性が制限される。

さらに、SDS および 2-メルカプトエタノールで処理することにより HBcAg を失活させるこ

とを含む生物学的に機能をもつ DNA 形質転換ベクターで形質転換された細菌、酵母もしくは哺乳類細胞の発現産物であるポリペプチドもまた本発明において好ましい。

本発明によるポリペプチドは、イムノアッセイに直接使用することができ、リポーターグループもしくは支持体に結合させてそのようなアッセイに使用することができ、またポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生させるため、もしくはワクチン製品として使用することができる。

つぎに実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 では HBcAg 産生クローンの構築が記載される。実施例 2 では、実施例 1 の HBcAg 産生クローンの欠失変異体の構築が説明される。実施例 3 は、HBcAg 発現産物および実施例 2 の欠失変異体の免疫反応性についてのアッセイの結果を示す。実施例 4 では、実施例 2 の欠失変異体からの HBeAg の産生および単離が説明される。実

施例5には、実質的にHBcAg活性をなくしHBcAg活性を保持するための精製および処理が記載される。実施例6では、EIAおよびRIA中和アッセイにおける本発明による組換えDNA HBcAgの性能が、ヒト血漿由来HBcAgの性能と比較される。実施例7では、本発明による組換えDNA HBcAgを用いた種々のイムノアッセイが記載される。実施例8では、本発明による抗血清およびポリクローナル抗体の製造が記載される。前記抗体は、HBcAgに特異的なものである。実施例9では、HBcAgに特異的な本発明によるモノクローナル抗体の製造が記載される。

実施例1

HBcAg産生クローンを構築するためには、HBcAgの生合成が可能な構築をすることが必要であった。

デイン粒子(慢性的に感染した個人の血清から単離)から単離したHBV DNAのクローニングを、バレンツェラの文献[Valenzuela et al, Nature, 280巻、815~819(1977

かめるため、またHBcAgをコードする遺伝子の位置を知るために、第1図に示すような、HBVクローン(pHBV-8と称す)の詳細な制限エンドヌクレアーゼ地図を作成した。この地図は、制限部位の位置を決定するために適当な単一もしくは複数の酵素で消化することにより作成した。発行されている制限エンドヌクレアーゼ地図および配列データ[バレンツェラ、Animal Virus Genetics、ヤーニッシュ(Jaenish et al)編、アカデミックプレス、57~70(1980);ガリパートら(Galibert et al)、Nature、281巻、646~650(1979)]と比較することにより、HBsAgまたはHBcAgをコードしている可能性のあるウィルスDNAの領域を同定した。

組換えDNAクローンがHBcAg合成のための完全な遺伝子を含んでいるかどうかを決定するために、HBcAgをコードしていると思われる(上記で引用した発行された地図および塩基配列に基づいて)領域の塩基配列を、マキサムらの文献[Mixam et al, Methods Enzymol., 68巻、

9)]に記載の方法に従って行った。

上記DNAを、生体内DNAポリメラーゼ反応[フルスカら(Hruska et al), J. Virol., 23巻、368~376(1977)]により³²P-ATPおよび³²P-CTPで標示し、ランダースら[Landers et al, J. Virol., 23巻、368~376(1977)]の方法に従って精製した。単離した材料から精製されたDNAはエンドヌクレアーゼEcoRIで消化し、約3200塩基対(bp)の単一のEcoRI断片を得た。この3200bp断片をプラスミドpBR322のEcoRI部位に連結し、この連結産物で大腸菌chi-1776株を形質転換した。形質転換の結果得られたコロニーは、テトラサイクリンに対する感受性[ボリバーら(Bollivar et al), Gene, 2巻、95~113(1977)]およびプラスミドの分析[バーンズ(Barnes), Science, 195巻、393~394(1977)]によりスクリーニングした。

材料がクローン化されたHBVであることを確

499~560(1980)]に記載の方法によって決定した。pHBV-8のクローン化HBcAg部位のスクレオチド配列を第2図に示す。得られたDNA配列を発行された配列と比較することにより、HBcAgのコード領域は完全であることがわかった。それゆえ、そのクローン化HBV DNAを、細菌でのHBcAg合成のためのプラスミドを製造するために用いた。

本実施例および以下の実施例においてクローンの構築のために用いられた組換えDNA技術は、マニアティスらの文献[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Maniatis et al, Cold Spring Laboratory, 75~186(1982)]に詳細に記載されている。HBcAgの合成のための分子構築は、第3図に図式的に説明されている。クローンpHBV-8のHBV DNA挿入体を制限エンドヌクレアーゼHhaI [ニュー・イングランド・バイオラプス、ビバリー、マサチューセツ(New England Biolabs, Beverly, Massachusetts)]で消化することから構築を始めた。消化は、製

造業者の説明書に従って、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM $MgCl_2$ および 0.5 mM ジチオトレイトールの存在下で行った。制限エンドヌクレアーゼ地図作成および核酸配列分析によって、およびヌクレオチド配列を発行された配列データ(バレンツエラら、上述)と比較することによって、上記消化の結果得られた 1 kbp DNA 断片が HBcAg のための完全なヌクレオチド配列を含んでいることが判った。

組換えタンパク質の実質的な量を得るために、 β -ガラクトシダーゼをコードするプラスミド由来の遺伝子にクローン化 DNA を融合することができ、この融合は、 β -ガラクトシダーゼの α -サブユニットをコードする領域内の「普通クローン化部位」を使用することによりなされる。 β -ガラクトシダーゼと HBcAg との間の融合物は安定である [スतालら (Stahl et al), Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 79 巻, 1606 ~ 1610 (1982)]。

プラスミド pUC9 [ビー・エル・バイオケミ

参照)。この酵素は、種々の長さの DNA 断片が得られるように DNA 分子の両末端から塩基を取り除く。BAL 31 (ニュー・イングランド・バイオラブズ) は製造業者の説明書に従って使用し、消化は、600 mM NaCl、12 mM $CaCl_2$ 、12 mM $MgCl_2$ 、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 1.0 mM EDTA の存在の下で行った。消化の程度をモニターするために、EDTA を 33 mM まで加えフェノール抽出することによって反応を 1, 2, 4, 6 および 8 分に停止させた。生成物をアゲロースゲル上の電気泳動により分析した。

ヌクレアーゼ BAL 31 処理によって生成した分子がプラントエンドを有していることを確認するために、一本鎖の特異的エンドヌクレアーゼであるヤエナリヌクレアーゼ (mung bean nuclease) およびプラントエンドを有する DNA 分子を生成することのできる酵素である T4 DNA ポリメラーゼでこれらの分子を処理した。ヤエナリヌクレアーゼ (ビー・エル・バイオケミカル

カルズ, P. L. Biochemicals, Milwaukee, Wisconsin)) を発現ベクターとして選択した。

このプラスミドは、各細胞中で少なくとも 10 ~ 15 コピーの遺伝子を発現し続けることができる。この遺伝子は、大腸菌 JM103 および JM83 株(ともにビー・エル・バイオケミカルズより入手可)中で β -ガラクトシダーゼを合成するために必要な遺伝子を含んでいる。

遺伝子(細菌宿主 JM103 または JM83 株のゲノム内)を、 β -ガラクトシダーゼプロモーター (P_{lac}) から転写される遺伝子の発現をコントロールするために用いることができる。タンパク質産物が宿主に対して毒性を有する場合には上記コントロールはきわめて有用である。

HBcAg をコードする領域の両側面に位置する部分は、肝炎 DNA の非コード配列である。それゆえ、これらの非コード領域は、最大の HBcAg 産生が得られるように注意深く削り取った。それは、HhaI DNA 断片をヌクレアーゼ BAL 31 による消化に供することにより行なった(第4図

ズ)は製造業者の説明書に従って使用し、BAL 31 処理した DNA の消化は、20 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.6)、50 mM NaCl、1 mM 硫酸亜鉛の存在下、37°C で 30 分間行なった。反応生成物は、ついでフェノール抽出しエタノールで沈澱させた。これらの生成物は、遠心分離し水中に溶解することによって回収したのち、製造業者の説明書に従って T4 DNA ポリメラーゼ (ビー・エル・バイオケミカルズ) で処理した。反応は、67 mM Tris-酢酸 (pH 6.7)、10 mM $MgCl_2$ 、5 mM ジチオトレイトール、50 μ g / ml BSA、および各 33 mM の dTTP, dCTP, dGTP, dATP の存在下で行った。反応混合物を 15°C で 30 分間、37°C で 10 分間インキュベートした。反応混合物中の生成物をアゲロースゲル電気泳動によって分離し、大きさが 700 ~ 900 塩基対の断片を電気泳動によってブールしエタノール沈澱によって収集した。

ブールし収集した HhaI 処理断片は、ついで SmaI で切断した pUC9 DNA [ベセスダ・リ

サーチ・ラブズ、ゲイターバーグ、メリーランド (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, Maryland) と等モル比で結合させた。上記DNAをエタノールで再沈殿させ、ついでベレット化して凍結乾燥した。試料を水中に溶かし、最終濃度で50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM ジチオトレイトール、1 mM ATP、10 mM $MgCl_2$ にした。ついでT4 DNAリガーゼ(ビー・エル・バイオケミカルズ)を加え、4℃で48時間連結反応を行った。

得られた連結DNA分子を、マンデルらの文献 [Mandel et al., J. Mol. Biol., 53巻、154(1970)] に記載の方法にしたがって、大腸菌JM83株のトランスフェクションに使用した。JM83株細胞を一夜培養したもの0.5 mlを、新鮮なNZY培地 [蒸留水14中にN-ZアミンタイプA (N-Z Amine type A, Humko Sheffield, Memphis, Tennessee) 10 g、NaCl 5 g、 $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 2 g、酵母エキス5 g、pHは6 N NaOHで7.0に調整] 5

トランスレーションにより、それ用のキット [アマーシャム、アーリントン・ハイツ、イリノイ (Amersham, Arlington Heights, Illinois)] を用いて³²Pで標識した。このプローブを、以降の細菌コロニーの同定に利用した。

個々の細菌コロニーを、lacプロモーターの制御下で遺伝子の発現を誘発する化学物質であるIPTG(ベセスダ・リサーチ・ラブズ) 4×10^{-4} Mの存在下、NZY培地20 ml中で一夜増殖させた。細菌細胞培養液を以下のようにして調製した [スーアルら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79巻、1606~1610(1982)]。細胞を25%シロ糖0.075 mlおよび50 mM Trisバッファー(pH 8)中に再び懸濁した。0.25 M Trisバッファー(pH 8)25 μlおよび0.25 M EDTAを加え、細胞を氷水浴中に5分間放置した。つぎに、1% Triton X-100[®]界面活性剤 [シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Company)]、0.4%デオキシコール酸ナトリウム、50 mM Trisバッ

0 ml中にすばやく接種し37℃で2時間増殖させた。ついで細菌細胞をベレット化し、10 mM NaCl 25 ml中で2回洗浄した。最終のベレットを30 mM $CaCl_2$ 25 ml中に再び懸濁し、氷浴に30分間放置した。この細胞をベレット化し、30 mM $CaCl_2$ 1.5 ml中に再び懸濁した。この細胞は、形質転換に適したものであった。細胞懸濁液200 μlに連結DNA 1 μgを加えた。細胞を氷上に5分間放置し、ついで42℃で2分間インキュベートすることによって熱ショックに付した。各トランスフェクションにNZY培地2.5 mlを加え、細胞を37℃で1.5時間インキュベートした。寒天1.5%およびアンピシリン40 μg/mlを加えたNZY培地を含むプレート上に細胞を広げた。プレートを37℃で一夜間インキュベートした。ついで、細菌コロニーをコロニーハイブリダイゼーション [マニアティスら、上述(1982)] に付してHBcAg遺伝子の挿入をスクリーニングした。HBcAgをコードする配列のみであると同定されたBgI[®]断片を、ニックト

ファー(pH 8)および62.5 mM EDTAの溶液0.12 mlを加えたのち、得られた細胞懸濁液を氷水浴中に0℃で10分間放置した。

細胞懸濁液をフルパワーで30秒間3回音波処理した。音波処理物を75 T1ローター [ベックマン・インダストリーズ、パロ・アルト、カリフォルニア (Beckmann Industries, Palo Alto, California)] 中で30,000 rpmで30分間遠心分離することにより清澄化した。

HBcAg遺伝子挿入物を有するプラスミドを含む個々の細菌コロニー(クローン)に由来する清澄化した音波処理物を、以下の方法によりHBcAg活性について免疫学的にスクリーニングした。清澄化した細菌培養液の試料0.2 mlを、いくつかのアッセイウェルの各々に加えた。抗HBcで覆われたビーズ [アボット・ラボラトリーズ (Abbott Laboratories)] をウェルに加え、室温で24時間インキュベートした。これらのビーズは、ついで水で3回洗浄した。¹²⁵Iで標識した抗HBc(放射活性最大7.7 μCi/ml;アボット

ト・ラボラトリーズより入手可)0.2mlを各ウェルに加え、45 H BcAg Cで4時間インキュベートした。つぎにビーズを水で3回洗浄し、ガンマカウンター(ANSR[®] 器具、アボット・ラボラトリーズ)中でガンマ放射をカウントした。

幾つかの細菌コロニーが、細菌中でH BcAgの生合成を行い得ることが見出された。異なったクローンがスクリーニングされた場合、H BcAg産生のレベルにおいて200倍もの違いがあった。この違いは、各クローンで異なる構築の一次構造に依存していることがわかった。H BcAgを最も高いレベルで産生したクローンは、12.88bと表した。クローン12.88bのコードストランドの一次構造をDNAシーケンシング【マキサムら、Methods Enzymol., 68巻、499~560(1980)】により決定し、第3図に示した。核酸配列から導き出されたH BcAgタンパク質融合ペプチドのアミノ酸配列を、第5図に示す。

同様に、単離されたHaeIII断片をHpaIIで消化することによってクローン18系列プラスミドが得られた。HpaIIでの消化はDNA分子上に付着端を生じるので、系列16のHpaII断片の末端はT4 DNAポリメラーゼを用いて塞ぎ、プラントエンド化された分子を得るようにする。

15および16の両系列消化物からのプラントエンド化された分子をHindIIIで切断し、ついでHindIIIおよびSmaIで切断されたpUC9プラスミドに連結し、これを大腸菌JM83株の細胞で形質転換するために用いた。

クローン18系列プラスミドは、クローン12.88bからH BcAg DNA配列が内部欠失したものである。クローン12.88bをBglIIで消化した。この消化物からの最も大きな断片は、pUC9プラスミドDNA、および内部のコアをコードする配列が欠失したH BcAg DNAを含んでいた。この断片断片を、実施例1と同様にし、再び環状化し、連結し、ついで大腸菌JM83株の細胞の形質転換に供すると、H BcAg遺伝

実施例2

H BcAg産生クローンの欠失変異体を、第6図に示すようにして構築した。3系列の構築物を作製した。クローン12.88bに対するそれらの関係を第7図に示す。制限酵素による消化を製造業者の説明書に従って行い、実施例1と同様にして連結反応を行った。

系列15および16の構築物は、実施例1の手順に従ってクローン12.88bからプラスミドを単離し、得られたプラスミドをHaeIIIで消化することによって調製した。

ついで、H BcAg遺伝子内にプラントエンド切断を生じるRsaI(ニュー・イングランド・バイオラブズ)でHaeIII断片を制限エンドヌクレアーゼ開裂することによりクローン15系列プラスミドを得た。得られたDNA断片は、ついで制限エンドヌクレアーゼHindIII(ベセスダ・リサーチ・ラブズ)で消化し、ついでSmaIおよびHindIIIで切断されたpUC9プラスミドDNAに直接連結した。

子の5'末端からのコード配列100bpおよびH BcAg遺伝子の3'末端からの30bpが単一のmRNAに転写された。上記コード配列の3'末端は、第5図に示したクローン12.88bの配列に基く5'コード配列と同じフレーム内にあるので、その領域によりコードされるタンパク質は、H BcAgのアミノ末端アミノ酸およびカルボキシル末端アミノ酸の両方を有する。

大腸菌JM83株をクローン15,16,および18系列プラスミドで形質転換したのち、形質転換体を実施例1の手順に従いコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。実施例1に記載したH BcAg DNAに特異的なプローブとハイブリダイズしたコロニーを、ついでH BcAg免疫反応性について分析した。

実施例3

各系列の一つのプラスミドを有する細胞を含む個々の細菌コロニーを、lacプロモーターの制御下で遺伝子の発現を誘発する化学物質であるインプロビルチオ-β-ガラクトシド(IPTG)4×

10⁻⁴Mの存在下、NZY培地中で一夜増殖させた。細菌細胞培養液を実施例1に記載したようにして調製し、ついで実施例5に一般的に記載されているようにしてHBcAgおよびHBeAgの両方について分析した。

HBcAgアッセイは実施例1に記載したようにして行った。このアッセイの結果を第1表に示す。

HBeAgアッセイでは、清澄化した細菌培養液の試料0.2mlを、いくつかのアッセイウェルの各々に加えた。抗HBeでコーティングしたビーズ(アボット・ラボラトリーズ)をウェルに加え、室温で24時間インキュベートした。ついでビーズを水で3回洗浄したあと、1%で標識した抗HBe(放射活性最大3.8μCi/ml、アボット・ラボラトリーズ)0.2mlを各ウェルに加えた。このアッセイの結果もまた第1表に示す。

し得ることを示している。

クローン16.4の配列を決定した。その結果を第8図に示す。クローン16.4のDNA配列を分析したところ、HBcAgコード配列の120bpが3'末端から欠失していることが見出された。このことは、タンパク質のカルボキシル末端から40個のHBcAgコードアミノ酸が欠損し、また細菌プラスミド配列との融合による9アミノ酸が添加されたことになる。クローン16.4の構築に就いて、天然のHBeAgのカルボキシル末端配列を決定した[タカハシら(Takahashi et al), J. Immunol., 130巻, 2903~2907 (1983)]。HBeAgのカルボキシル末端アミノ酸は、-Thr-Thr-Val-Valまたは-Thr-Thrであり、一方、クローン16.4においてコードされたHBeAgのカルボキシル末端アミノ酸は-Leu-Pro-Gluである。これらのアミノ酸は、天然のHBeAgに見られるThr-Thrのすぐ隣にある。それゆえ、クローン16.4により産生された抗原は、天然のHBeAgに見られるア

第1表

	HBcAg試験 c.p.m	HBeAg試験 c.p.m
クローン 15.3	28,000	46,000
クローン 15.8	24,000	15,000
クローン 15.10	6,000	9,000
クローン 16.2	118,442	172,830
クローン 16.4	89,206	163,280
クローン 18	3,500	7,200
クローン 12.88b	120,424	30,000
陰性対照 (PBS+10%胎子血清)	500	300

各系列のすべてのクローンを両方のアッセイで反応させた。期待されたように、発現プラスミド中に残ったHBcAgコード配列が少なくなればなるほど、HBcAgアッセイ反応性は少なくなった。HBcAgおよびHBeAgアッセイでのクローン16.2およびクローン16.4の発現産物が相対的な反応性を示すことから、これら二つのクローンは天然のHBeAgに類似したポリペプチドを発現

ミノ酸の2~4個が欠落している。

天然におけるHBcAgのHBeAgへの変換は、抗原のタンパク質分解酵素による開裂とタンパク質の3次構造の変化とを含む2工程でおこなわれるものと思われる。タンパク質分解酵素による開裂の工程は、本発明ではHBcAgコード配列の欠失で置き換えられている。欠失変異体クローン16.4は、そのタンパク質がβ-ガラクトシダーゼのα-サブユニットに融合され、また抗原産生細胞から抽出されたときに、集合した複合体として存在する他は、天然のHBeAgに非常によく似たタンパク質を産生する。これらの分子集合体の変性は、分子が真のHBeAg特性を有するようになるために必要であるように思われる。変性によるこの効果は、クローン12.88b抗原およびクローン16.2抗原を種々の変性条件に処理したときの比較から明らかである。

クローン12.88bおよびクローン16.2からの細菌抗原(すでに記載したようにして調製)の当量を試験管に等分に分け、塩およびバッファ

濃度を所望の最終濃度に調整した。処理 I に供した試験管には、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl および 1 mM EDTA を加えた。処理 II に供した試験管には、50 mM Tris-HCl (pH 8.5)、8 M GuHCl、6 mM EDTA および 6 mM ジチオトレイトールを加えた。処理 III に供した試験管には、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウムおよび 10 mM β -メルカプトエタノールを加えた。ついで、これらのバッファー中の抗原を 45°C で 30 分間加熱した。調製物は、ついで 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl および 1 mM EDTA を含むバッファーに対し徹底的に透析した。ついで抗原調製物は、すでに述べたような HBcAg および HBsAg アッセイにてそれらの反応性について分析した。すべての結果は、抗原を非変性条件にさらすバッファーを用いた処理 I の結果を基準にして表わした。結果を第 2 表に示す。第 2 表は、HBcAg おける HBsAg

2.88b の HBcAg 遺伝子産物全体を変性条件に供しても、分子上の HBcAg 反応性エピトープを取り除くことはできない。欠変異体 16.2 を変性剤で処理することのみが、HBsAg アッセイにおいて優先的に反応性を示す材料を提供することができる。これらの結果は、HBsAg にのみ反応性を示す分子が欠変および変性によって生成され得ることを示す最初のものであった。

実施例 4

クローン 16.2 の増殖および HBsAg の単離を以下のようにして行った。それぞれ NZY+チアミンブロス [ディフコ、デトロイト、ミシガン (Difco, Detroit, Michigan)] 2 g を入れた 4 g フラスコ 5 本を調製し、製造業者の説明書に従ってオートクレーブに付した。培地を冷却すると同時にアンピシリン 200 mg および IPTG (シグマ・ケミカル・カンパニー) を各フラスコに無菌的に加え、攪拌して混合した。

夜のうちに開始した培養液から大腸菌 15 ml を各フラスコにとり、 200 ± 25 rpm、37°C で

イムノアッセイにおける組換え DNA HBcAg および HBsAg の反応性に対する変性の効果を示すものである。

第 2 表

処理	クローン 12.88b 抗原		クローン 16.2 抗原	
	HBcAg アッセイ	HBsAg アッセイ	HBcAg アッセイ	HBsAg アッセイ
I	100%	100%	100%	100%
II	113%	130%	8%	103%
III	124%	146%	18%	107%

上記の結果から明らかなように、クローン 12.88b およびクローン 16.2 からのタンパク質を非変性条件に供すると HBcAg および HBsAg の両方のアッセイにおいて反応性のタンパク質となることから、HBcAg 遺伝子配列の欠変が、純粋に HBsAg 反応性の分子を生成させるには不充分である。さらに、クローン 12.88b についての処理 II、III および HBcAg と HBsAg アッセイにおける反応性に示されているように、クローン 1

22 ± 6 時間攪拌した。インキュベーション後、5 本のフラスコはかなりの細菌性生物量を有していることが視覚的に認められた。細菌は、 $410 \times g$ 、2~8°C で 20 分間ペレット化し、清澄された培地は捨てた。ペレットは、残る手順のために氷上に置いた。ペレットを、M9 最小塩溶液 (ディフコ、デトロイト、ミシガン) と 2 % グルコースとの懸濁液 300 ml に再び懸濁し、プールした。細菌懸濁液を再び上記のようにしてペレット化し、上澄み液を捨てた。

0.05 M Tris (pH 8.0) に 25 % シロ糖を加えたバッファー 67.5 ml を含む溶液を細菌ペレットに加え、ペレットをバスツールピペットで再び懸濁して細菌の懸集塊をばらばらにした。0.25 M Tris および 0.25 M EDTA (pH 8.0) からなるバッファーを調製し、25 ml を細菌懸濁液に加えた。懸濁液を攪拌し、氷上に放置して 10 分間インキュベートした。細菌バッファー [0.5 M Tris、1 % Triron X-100、0.01 M EDTA、アプロチニン 1 mg および

フェニルメチルスルホニルフラ化物(PMSF)22mgを前もって冷却し、この溶菌バッファー108mlを上記細菌懸濁液に加えた。得られた溶液を、各サイクルの間を1もしくは2分間あけて、それぞれビブラーセル(Vibra-Cell)音波処理器[サイエンス・アンド・マテリアルズ・インコーポレーテッド、ダンベリー、コネチカット(Science and Materials Inc., Danbury, Connecticut)]を用い、30秒間10回音波処理した。

音波処理した細菌懸濁液を各遠心管に振り分け、135,000×gで30分間回転させて溶液を清澄化した。運転を終えると、組換えタンパク質を含む清澄化した溶菌液をデカントにより取得し、ペレットは捨てた。溶菌液を直線シロ糖勾配(0%~60%)に置き、18~24時間遠心分離した。各フラクションを集め、市販の診断試験キット(Abbott-HBeとしてアボット・ラボラトリーズから入手可)を用いてHBeAg活性の存在についてアッセイした。最も高いHBeAg活性を有

血漿で1:100に希釈した。

第3表

	比活性 (抗原活性/mgタンパク質)	
	HBeAg活性	HBcAg活性
変性前	4.2×10^4	1.2×10^4
変性後、すばやく 1:100希釈した 非透析材料	3.84×10^4	-0-
変性後、透析した 材料	7.72×10^4	1.06×10^4

第3表の結果から明らかなように、変性させたタンパク質溶液を透析するとHBeAg活性が増加する。それゆえ、透析は、実質的にHBeAg活性がなく有意のHBeAg活性を有する材料を得る方法としては適当ではない。材料を直接1:100に希釈する方法を用いるべきである。

第3表において、抗原活性は、試料を希釈因子により増幅して得られるA₄₉₂またはcpmとして測定される。変性前に行なわれたアッセイはエンザイムイムノアッセイ(EIA)であり、その結果は

するフラクションをブールし、変性の工程まで保管した。得られたシロ糖勾配ブールは、上述したHBeAgアッセイで試験したように、中位の程度のHBeAg活性とともに有意のHBeAg活性を示す。

上記フラクションを変性および希釈の工程に付すことにより、高いHBeAg活性を有し、HBcAg活性の欠けたポリペプチド産物が得られる。この工程には、カオトロブ剤、好ましくは8M塩酸グアニジン(GuHCl)中で組換えタンパク質を変性させ、続いて非変性剤、好ましくはヒト血漿中で速やかに希釈することが含まれる。

実施例5

50mM Tris(pH 8.5)中の10M GuHCl 52mlを、蒸留水中の0.1M EDTA 4.0ml、蒸留水中の0.1Mジチオトレイトール(DTT) 4.0ml、およびクローン16.4のシロ糖ブール 5.0mlに加えた。この溶液を混合し、45℃の水浴中に置き、この温度で30分間インキュベートした。変性させたHBeAg溶液を、直ちにヒト

希釈因子により増幅したA₄₉₂として示されている。変性後に行なわれたアッセイはラジオイムノアッセイであり、それゆえ結果は試料を希釈因子により増幅したcpmとして表されている。非透析材料のHBcAg活性アッセイにおける「-0-」の値は、試料のcpmがアッセイの基底値と等価であることを示している。

一般に、本発明による抗原の復元のための特定の条件の有効性は、ムシャワールらの文献[(Mushahwar et al, J. Med. Virol., 2巻, 77(1978))]に記載されているようなHBeAgアッセイにおいてHBeAg活性が存在することに加えて、パーセルらの文献[(Purcell et al, Intervirology, 2巻, 231(1973))]に記載されているようなHBcAgアッセイで試験されたときに、同じ材料について実質的にHBcAg活性がないということによって決定することができる。

HBeAgアッセイは、文献記載のとおりに行った。高い抗HBc力価を有するが抗HBeの検出さ

れない(市販のキット、アボット・ラボラトリーズにより決定)ヒト血清からの精製したIgGを、1/4インチのポリスチレンビーズ上にコーティングした。抗HBcAgのコーティング濃度は10~30ng/mlであった。これらのコーティングしたビーズを、試料とともに40℃で2時間、または室温で一晩インキュベートした。ビーズを洗浄し、ついで、クロロミンTを用い¹²⁵Iで標識するかまたはナカネ[Nakane, J. Histochem. Cytochem., 22巻, 1084(1974)]の方法により西洋ワサビペルオキシダーゼと複合した精製ヒト抗HBcととともにインキュベートした。40℃で2時間インキュベートしたのち、ビーズを洗浄し、RIAの手法により放射活性をカウントするか、またはEIAの手法によりOPD(オーフェニレンジアミン)を含む溶液に加え、室温で30分間インキュベートしたのち、OPD溶液吸光度を分光光度計で測定した。

本実施例に記載された組換えDNA HBsAgは、陰性(negative)ヒト血清中にさらに希釈し、

(カットオフ)と同等またはそれ以下のカウント/分または吸光度を有する試料は、反応性(「陽性」とみなされる。

一般に、HBsAg中和剤の供給源はヒト血清である。実施例5で製造された組換えDNA由来のHBsAg(組換えDNA HBsAg)は、ヒト血清から単離されたHBsAgと免疫原性において同一である。組換えDNA HBsAgを含む中和剤は、抗HBsアッセイにおいてヒト血清由来中和剤(hpHBsAg)の代わりに用いることができる。データは、抗HBs試験におけるRIAおよびEIAの両手法において、組換えDNA HBsAg中和剤を使用することによって血清由来の中和剤を使用するよりも一層優れた感受性が得られることを示している。

B型肝炎表面抗原(HBsAg)に対し陽性と分析された試料を用いると、組換えDNA HBsAg中和剤を血清由来中和剤の代わりに用いた場合に、抗HBs RIA試験では98%の一致、抗HBs EIA試験では99%の一致がえられた。すべて

以下に記載する抗HBsイムノアッセイにおいて中和剤として用いることができる。組換えDNA HBsAgはまた、標準タンパク濃縮法(すなわち真空透析)により濃縮することができる。

実施例6

抗HBs試験のRIAおよびEIAの両手法において、抗HBsでコーティングしたビーズを、患者の試料、およびHBsAgを含む中和剤とともに同時にインキュベートする。患者試料中に存在する抗HBsは、中和剤中のHBsAgがビーズに結合するのを妨げるであろう。この最初のインキュベーションの後、結合しなかった材料はビーズを洗浄することにより取り除く。ついでビーズを、¹²⁵Iで標識した抗HBs(RIA手法)かまたは西洋ワサビペルオキシダーゼと複合した抗HBs(EIA手法)を用いて第2工程でインキュベートする。RIA手法では、ビーズを洗浄し、直ちに放射活性をカウントする。EIA手法では、ビーズを酵素基質とともにインキュベートして色の変化を生じさせ、ついで吸光度を決定する。計算値

の一致しない試料は、血清由来の中和剤を用いた抗HBsについては陰性であったが、組換えDNA HBsAg中和剤を用いた抗HBsAgについては陽性であった。これらの不一致は、組換えDNA HBsAg中和剤を用いたときに試験の感受性が増大した結果によるものである。特異性は、HBsAg陰性の試料を試験することにより決定した。データは、抗HBs EIA試験において、血清由来の中和剤と組換えDNA HBsAg中和剤との間で99.7%の一致があることを示した。

組換えDNA HBsAg中和剤およびその等価物である血清由来の中和剤の特異性を証明するために、HBsAg陰性血清の約200試料における抗HBsの頻度分布を調べた。

HBsAg陰性血清における抗HBs反応性試料の頻度分布は、RIA(アボットHBs、アボット・ラボラトリーズ)については第9および10図に、EIA(アボットHBs EIA、アボット・ラボラトリーズ)については第11および12図にそれぞれ示されている。データは、%中和に対する

頻度(試料数)としてプロットされている。両試験における%中和は、以下のようにして決定される。

$$\%N = \frac{NCM - SM}{NCM - PCM} \times 100$$

(式中、%Nは%中和、NCMは陰性対照平均、SMは試料平均、PCMは陽性対照平均をそれぞれ表す)

%中和が50%より大きい試料は、反応性とみなされる。

第4表に示すように、RIAにより試験した200個のHBsAg陽性血清の集団において、組換えDNA HBsAg中和剤を用いたときに1個の試料が抗HBeに対して反応性であることがわかった。この試料は、カットオフ値をやっと上回っていた。血漿由来中和剤では、抗HBsAgに対して反応性の試料は見出されなかった。全体の一致は99.50%であった。

同じく第4表に示されているように、200個のHBsAg陽性試料をアボットHBe EIAで試験したときに、どちらの中和剤を用いてもすべ

和剤とを比較するために、200個の血清試料のHBsAg陽性集団における抗HBeの頻度分布を測定した。組換えDNA HBsAg中和剤およびhpHBsAg中和剤を用いたRIAおよびEIAにおける抗HBe反応性試料の頻度分布を、第13、14、15および16図にそれぞれ示す。

RIAにより試験したHBsAg陽性試料の集団において、現行の中和剤では64個の試料が陰性であった。組換えDNA HBsAg中和剤を用いると、60個の試料が陰性であった。第5表に示すように、両アッセイの間の一貫度は98.0%である。

同じ集団をEIAで試験したときに、現行の中和剤を用いると60個の試料が陰性であった。組換えDNA HBsAg中和剤を用いると、58個の試料が陰性であった。同じく第5表に示されているように、この場合の両アッセイの間の一貫度は99.0%である。

の試料が陰性であった。したがって、一致は100%であった。

第4表

HBsAg陽性集団			
		組換えDNA	HBsAg
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	0	0
	陰性	1	199
一致=199/200=99.5%			
組換えDNA HBsAg			
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	0	0
	陰性	0	200
一致=200/200=100%			

これらのデータは、陰性集団を評価したときに、組換えDNA HBsAg中和剤を用いることがhpHBsAg中和剤と同様の特異性を示すものであることを証明している。

組換えDNA HBsAg中和剤とhpHBsAg中

第5表

HBsAg陽性集団			
		組換えDNA	HBsAg
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	136	0
	陰性	4	60
196/200=98.0%一致			
組換えDNA HBsAg			
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	140	0
	陰性	2	58
198/200=99.0%一致			

これらの結果は、組換えDNA HBsAg中和剤とhpHBsAg中和剤との間の全体的な一致度が98.5%であることを示している。hpHBsAg中和剤を用いて陽性と分析されるすべての試料はまた、組換えDNA HBsAg中和剤を用いても陽性である。すべての一致しない試料はhpHBsAg中和剤を用いて陰性と分析されるが、組換え

DNA HBeAg中和剤を用いると陽性と分析される。これらの試料はHBeAg陽性であることが知られているので、組換えDNA中和剤とhpHBeAg中和剤との間の不一致は、組換えDNA由来の中和剤を用いたことにより感受性が増大した結果である。

5個の抗HBe陽性試料の倍散希釈体について、hpHBeAg中和剤および組換えDNA HBeAg中和剤の両方を用い、RIAおよびEIAによりアッセイした。

第6表に示すように、組換えDNA HBeAg中和剤を用いた抗HBe試験は、5個の試料のすべてについて、現行の中和剤を用いた抗HBe試験と同等またはそれ以上の優れた感受性を示している。第6表は、アボット抗HBe RIAおよびEIAにおいて組換えDNA HBeAg中和剤を現行のhpHBeAg中和剤と比較した相互最終希釈倍散(reciprocal endpoint dilutions)を表す。

抗血清を製造するために、またはモノクローナル抗体を製造するために動物を免疫するのに用いることができる。さらに、精製されたHBeAg調製物は、B型肝炎ウイルスの感染を防御するためのワクチンとして用いることができる。これらの抗体は、患者におけるHBeAgまたはその対応する抗体(抗HBe)の存在を検出するために、従来のラジオイムノアッセイまたはエンザイムイムノアッセイに組み込むことができる。主要な利点は、HBeAg調製物が連続的に得られることと、その均一性にある。本発明に従って製造される精製組換えHBeAgは、天然のHBeAgに比べて非常に安定である。

実施例7

本実施例においては、HBeAgに対する抗体を検出するために本発明による組換えHBeAgを利用した他のイムノアッセイについて記載する。

抗HBeを検出するための幾つかのイムノアッセイを、組換えDNA HBeAgを用いて展開した。その三つの例を以下に述べる。

第6表

試料	アボット抗HBe RIA		アボット抗HBe EIA	
	hpHBeAg	組換えDNA HBeAg	hpHBeAg	組換えDNA HBeAg
1	1	4	2	8
2	2	2	1	4
3	8	>16	4	8
4	1	2	-	2
5	4	4	1	8

これらのデータは、中和剤に組換えDNA HBeAgを使用することによってhpHBeAg中和剤よりも大きな感受性が得られることを示している。ここに記載した方法による組換えDNA由来のHBeAgの精製によれば、血清HBeAgの精製によるか、またはHBeAg調製物から一層複雑な工程によりHBeAgを製造することにより得られるよりも、高度に精製されたHBeAg調製物が一層大量に一つの精製工程で得られる。

精製されたHBeAg調製物は、ポリクローナル

A) 組換えDNA HBeAgは、HBeAgに対する抗体を検出するためにサンドイッチアッセイに使用することができる。このアッセイでは、組換えDNA HBeAgでコーティングした固相(マイクロタイター、ポリスチレンビーズ、マイクロビーズ)を試料とともにインキュベートし、洗浄し、ついでRIAのために放射線検出するかEIAのために酵素と複合した組換えDNA HBeAgを含む溶液と反応させる。

B) 組換えDNA HBeAgは、コンペティティブイムノアッセイに用いることができる。このアッセイでは、組換えDNA HBeAgを固相上にコーティングし、試験試料および標識した抗HBeAg抗体(ポリクローナルかまたはモノクローナル)とともにインキュベートする。もしHBeAgに対する抗体が試験試料中に存在するならば、この抗体は標識した抗HBeが固相に結合するのに対し拮抗するであろう。

C) 組換えHBeAgを固相上にコーティングし、試験試料(ヒト血清)とともにインキュベート

する。固相を洗浄し、ついでヤギ抗ヒトIgGやヤギ抗ヒトIgMのような標識した抗ヒト抗体とともにインキュベートする。

実施例8

精製した組換えDNA HBeAgは、抗血清を製造するために用いることができる。

抗血清は、以下のようにして本発明による精製ポリペプチドを注射してウサギを免疫することによって特異的に製造することができる。最初の接種物は、抗原および完全フロインドアジュバントを含む。次の接種物は、抗原および0.25mgの不完全フロインドアジュバントを含む。動物から採血して血清を得る。ポリクローナル抗体は、アフィニティクロマトグラフィーにより血清から単離することができる。

実施例9

本発明によるモノクローナル抗体は、グリーンバーグら [Greenberg et al., Infect. Immun., 39巻, 91~99 (1983)] の方法に従い、そこで用いられている免疫原細胞を本発明によ

地図を表す。第2図は、プラスミドpHBV-8のB型肝炎ウイルスコア遺伝子のヌクレオチド配列を表す。第3図は、HBeAg産生の組換えDNAの構築を表すフローチャートである。第4図は、HBeAgを発現するクローンの構築を表すフローチャートである。第5図は、クローン12.88bのコードストランドのヌクレオチド配列およびそれから導き出されたアミノ酸配列を表す。第6図は、クローン12.88bの欠変異体の構築を表すフローチャートである。第7図は、欠変異体構築物をもとのクローン12.88bと比較したものである。第8図は、クローン16.4のヌクレオチド配列およびそれから導き出されたアミノ酸配列を表す。第9図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第10図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第11図は、HBsAg陽性集団で行な

る濃縮した組換えDNA HBeAgの溶液で置き換えることによって製造することができる。

基本的に、モノクローナル抗体は、実施例5に記載したように免疫量の組換えDNA HBeAgタンパク質をマウスに注射することによって製造することができる。免疫された動物から脾臓を取り、ポリエチレングリコールのような融合原を用いて脾臓細胞をミエロマ細胞(たとえばNS-1細胞)と融合させる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞をHAT培地中で選択する。組換えDNA HBeAgタンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、上記ハイブリドーマ細胞を培養した培地からアフィニティクロマトグラフィーによって単離することができる。これらのモノクローナルおよびポリクローナル抗体は、HBeAgおよび抗HBeイムノアッセイを展開するために用いることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpHBV-8のB型肝炎ウイルスDNA挿入体の制限エンドスクレーゼ

われた抗HBe EIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第2図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe EIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第3図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第4図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第5図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe EIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第6図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe EIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。

特許出願人 アボット・ラボラトリーズ

代理人 弁理士 青山 淳 (ほか1名)

FIG. 1

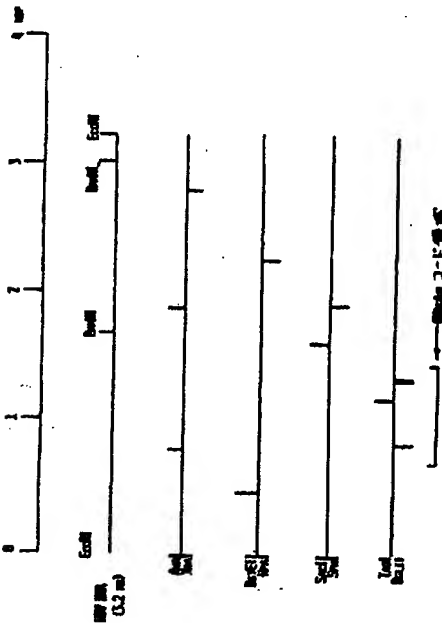


FIG. 2

100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000
 10010
 10020
 10030
 10040
 10050
 10060
 10070
 10080
 10090
 10100
 10110
 10120
 10130
 10140
 10150
 10160
 10170
 10180
 10190
 10200
 10210
 10220
 10230
 10240
 10250
 10260
 10270
 10280
 10290
 10300
 10310
 10320
 10330
 10340
 10350
 10360
 10370
 10380
 10390
 10400
 10410
 10420
 10430
 10440
 10450
 10460
 10470
 10480
 10490
 10500
 10510
 10520
 10530
 10540
 10550
 10560
 10570
 10580
 10590
 10600
 10610
 10620
 10630
 10640
 10650
 10660
 10670
 10680
 10690
 10700
 10710
 10720
 10730
 10740
 10750
 10760
 10770
 10780
 10790
 10800
 10810
 10820
 10830
 10840
 10850
 10860
 10870
 10880
 10890
 10900
 10910
 10920
 10930
 10940
 10950
 10960
 10970
 10980
 10990
 11000
 11010
 11020
 11030
 11040
 11050
 11060
 11070
 11080
 11090
 11100
 11110
 11120
 11130
 11140
 11150
 11160
 11170
 11180
 11190
 11200
 11210
 11220
 11230
 11240
 11250
 11260
 11270
 11280
 11290
 11300
 11310
 11320
 11330
 11340
 11350
 11360
 11370
 11380
 11390
 11400
 11410
 11420
 11430
 11440
 11450
 11460
 11470
 11480
 11490
 11500
 11510
 11520
 11530
 11540
 11550
 11560
 11570
 11580
 11590
 11600
 11610
 11620
 11630
 11640
 11650
 11660
 11670
 11680
 11690
 11700
 11710
 11720
 11730
 11740
 11750
 11760
 11770
 11780
 11790
 11800
 11810
 11820
 11830
 11840
 11850
 11860
 11870
 11880
 11890
 11900
 11910
 11920
 11930
 11940
 11950
 11960
 11970
 11980
 11990
 12000
 12010
 12020
 12030
 12040
 12050
 12060
 12070
 12080
 12090
 12100
 12110
 12120
 12130
 12140
 12150
 12160
 12170
 12180
 12190
 12200
 12210
 12220
 12230
 12240
 12250
 12260
 12270
 12280
 12290
 12300
 12310
 12320
 12330
 12340
 12350
 12360
 12370
 12380
 12390
 12400
 12410
 12420
 12430
 12440
 12450
 12460
 12470
 12480
 12490
 12500
 12510
 12520
 12530
 12540
 12550
 12560
 12570
 12580
 12590
 12600
 12610
 12620
 12630
 12640
 12650
 12660
 12670
 12680
 12690
 12700
 12710
 12720
 12730
 12740
 12750
 12760
 12770
 12780
 12790
 12800
 12810
 12820
 12830
 12840
 12850
 12860
 12870
 12880
 12890
 12900
 12910
 12920
 12930
 12940
 12950
 12960
 12970
 12980
 12990
 13000
 13010
 13020
 13030
 13040
 13050
 13060
 13070
 13080
 13090
 13100
 13110
 13120
 13130
 13140
 13150
 13160
 13170
 13180
 13190
 13200
 13210
 13220
 13230
 13240
 13250

FIG. 5

----- 組蛋白-グロブリン-ゼリン-配列 ----- MBV DNA 挿入開始

Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Pro	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Met	Asp	Asp
80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Asp
332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352
Asp	Asp	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	G												

FIG. 6

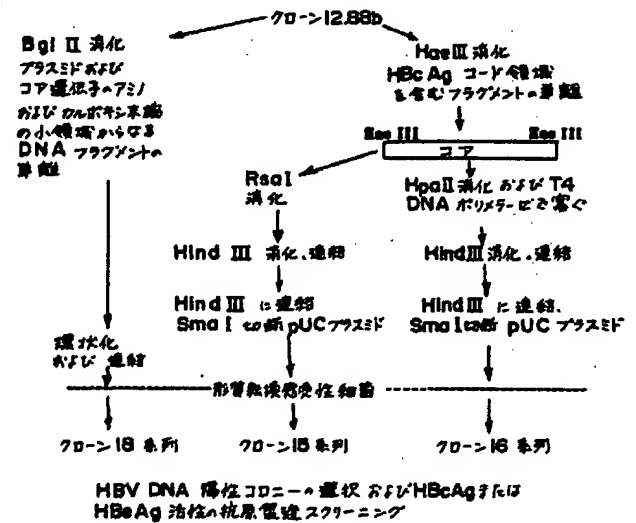


FIG. 7

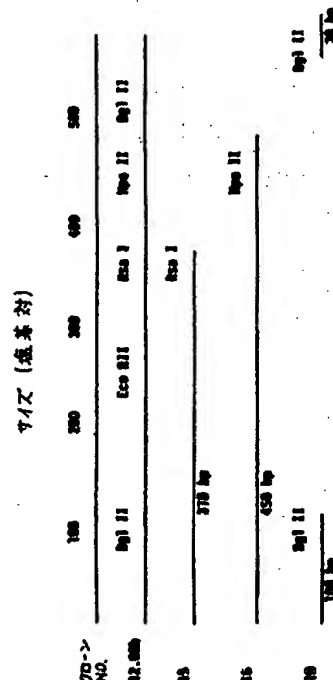


FIG. 8

[illegible]

傾度

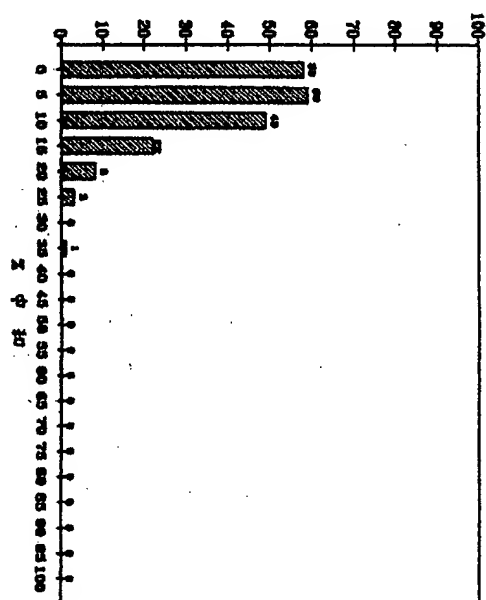
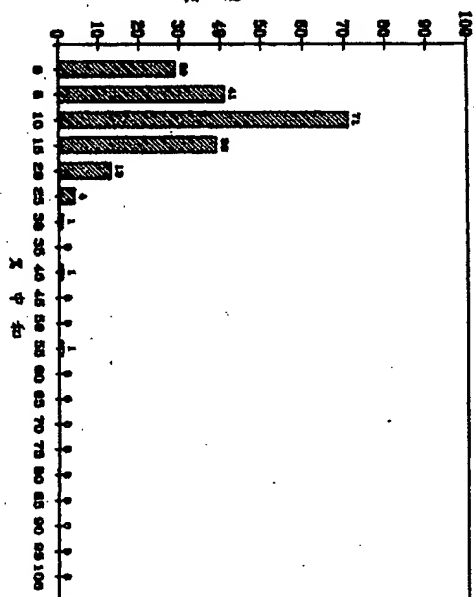


FIG. 10

FIG. 9

傾度



傾度

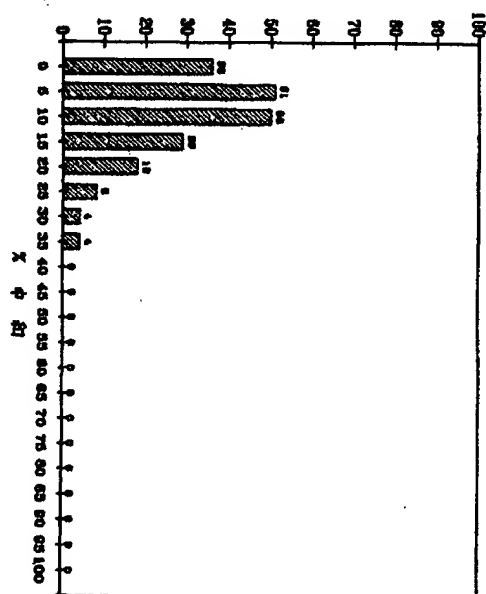


FIG. 12

FIG. 11

傾度

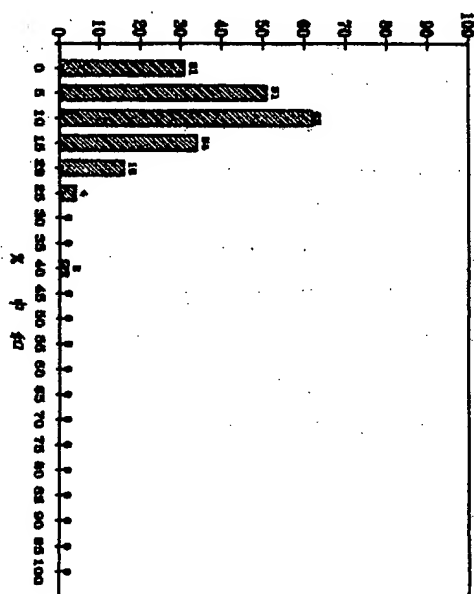


FIG. 14

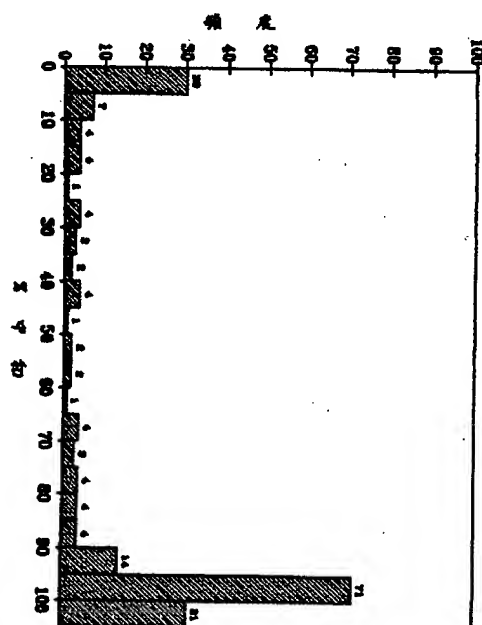


FIG. 13

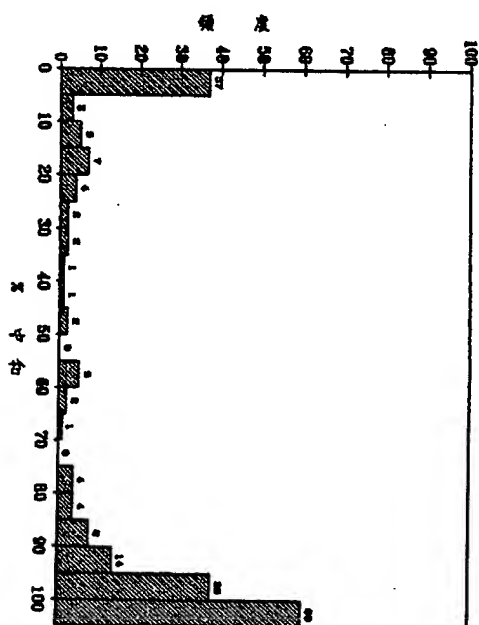


FIG. 15

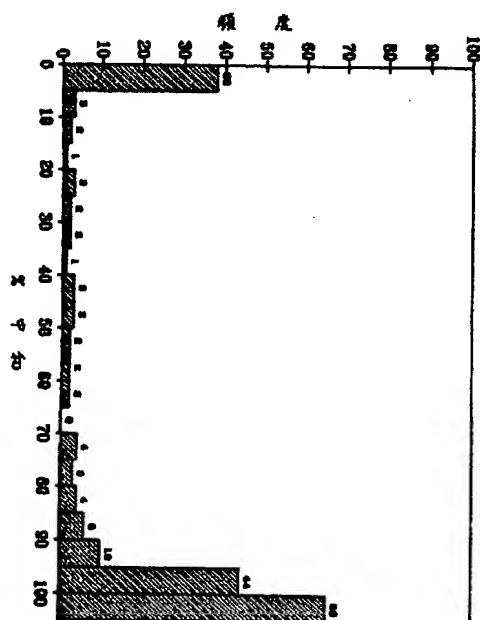
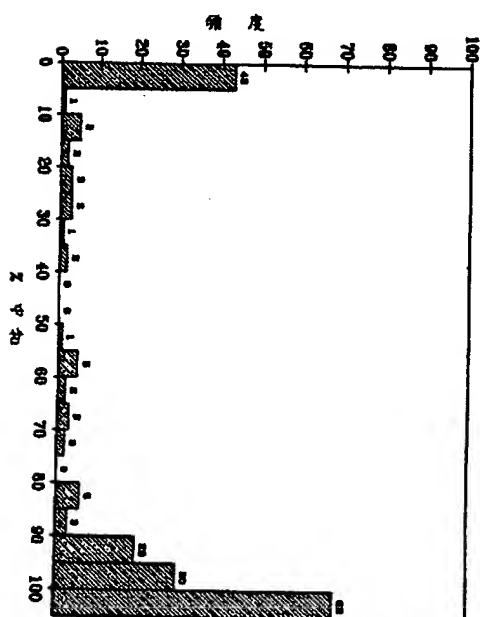


FIG. 16



第1頁の続き

⑤ Int. Cl. ⁴

識別記号

庁内整理番号

C	07	K	15/04
C	12	N	5/00
			15/00

C	12	N	5/00
			15/00

15/00

C 12 P 21/00

21/02

C 12 Q 21/02
1/00

G 01 N 33/576

33/57

83/517
21/00

C 12 R 1:91)

(C 12 P 21/00)

C 12 R 1:19)

8318-4H

B-6760-4B

C-8412-4B

A-8412-4B

D-6712-4B

C-6712-4B

6807-4B

B-7906-2G

B-7906-2G

⑫発 明 者 ジョナサン・エム・ス
トラー

トラー

アメリカ合衆国イリノイ 60050、マツケンリー、クリークサイド 105番

クサイド 105番